

研究報告書

「腸内代謝産物を標的とした疾患予防・治療基盤技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 福田 真嗣

1. 研究のねらい

われわれの腸管内には数百種類以上でおよそ数十～100 兆個にもおよぶとされる腸内細菌が生息しており、これら腸内細菌叢は宿主の腸管上皮細胞や粘膜免疫細胞、さらには腸管に局在する神経細胞や内分泌細胞とも複雑に相互作用することで、腸管内における複雑な生態系、すなわち「腸内エコシステム」を形成している。腸内エコシステムは通常はこれら異種生物間の絶妙なバランスの元に宿主の恒常性を維持しているが、そのバランスが一度破綻すると、炎症性腸疾患や大腸がんといった腸管局所の疾患のみならず、自己免疫疾患や代謝疾患といった全身性疾患に繋がるということが知られている。近年の報告で、大腸がんや肝臓がんなどのがん疾患や、動脈硬化や慢性腎臓病、さらにはある種の自閉症などの発症や増悪に腸内細菌叢由来代謝産物が深く関わっていることが報告されているが、これは腸内細菌叢のバランスの乱れ(これを *dysbiosis* と呼ぶ)による腸管内での異常代謝が疾患関連代謝産物の産生を促していると考えられているが、それらがどのような化合物を基質とし、どのような腸内細菌がどのように代謝することで産生されるのか、すなわち腸内エコシステムにおける詳細な腸内細菌叢由来代謝産物産生経路は不明な点が多い。本研究のねらいは、生体の恒常性維持や疾患発症に深く関わることが報告されている腸内細菌叢由来代謝物質に着目し、腸管内におけるそれらの産生量を自在に操るための方法論を、マイクロ流体デバイス技術や、メタボロミクスとメタゲノミクスを組み合わせたメタボロゲノミクスアプローチを駆使して確立することにある。本解析手法が確立できれば、最終的には腸内環境を標的とした創薬による疾患治療や、食を介した腸内環境の調節に伴う健康維持・疾患予防に向けた新たな健康維持基盤技術の創出が可能になると考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす宿主生体修飾機構の詳細を知るための基盤情報として、マウス消化管内の腸内細菌叢プロファイルおよび代謝物質プロファイルについて網羅的に解析を行った。その結果、アミノ酸や糖質などの分布が消化管各部位で異なり、それらと相関して腸内細菌叢プロファイルも変化することが明らかとなった(論文 1)。次に食と腸内環境との関連を知る目的で、マウスに欧米食を与えた際の腸内環境の特徴について網羅的に解析した。その際の腸内環境評価手法として、腸内細菌叢のメタゲノム解析と腸内代謝物質のメタボローム解析を組み合わせたメタボロゲノミクス(メタボロミクス+メタゲノミクス)を新たに考案した。本手法を用いて解析を行ったところ、短鎖細胞酸の一つである酪酸の産生量と酪酸産生遺伝子、および酪酸産生菌の割合が相関することが明らかとなった(論文 2)。疾患と腸内細菌叢との関連を理解する目的で、既に腸内細菌叢の関与が示唆されている慢性腎臓病についてメタボロゲノミクスアプローチにより解析を行ったところ、腸内細菌叢由来尿毒症物質を複数同定した。この時、腸内細菌叢を持たない無菌マウスに慢性腎臓病を誘導したところ、予想に反して腸内細菌叢をもつ SPF マウスよりもその症状が悪化した。これらの結果から、腸内細菌叢由来代謝物質中には、慢性腎臓病を増悪する尿毒症物質に加えて、腎機能を保護する代謝物質も同時に存在する可能性が示唆された(論文 3, 4)。次に腸管感染症と腸内細菌叢由来代謝物質について、ミシガン大学医学部 Nunez 教授らとの共同研究としてマウスモデルを用いて解析を行ったところ、新生仔マウス由来の腸内細菌叢から産生されるコ

ハク酸が、クロストリジウム目細菌群の腸内環境への定着を促し、結果として腸内細菌叢が成熟化することで腸管感染症への抵抗生が高まることが明らかとなった(論文 5)。以上の結果から、新たに考案したメタボロゲノミクスアプローチにより、宿主-腸内細菌叢間相互作用の詳細が浮き彫りとなり、それらがもたらす宿主恒常性維持や疾患発症に関わる分子機構の一端を明らかにすることができた。本研究成果は、腸内環境に基づく新たな疾患予防・治療基盤技術の創出に繋がることが期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「消化管内代謝物質の網羅的探索」

腸内細菌叢由来代謝物質が、生体恒常性の維持や疾患発症に関与することは明らかであるが、それらが消化管内にどのように局在し、どういった腸内細菌による代謝によって産生されるのかに関する基盤情報は少ない。そこで無菌マウスおよび腸内細菌叢を有する SPF マウスを用いて、各マウスの胃や小腸、盲腸や大腸といった、消化管各部位における代謝物質プロファイルと細菌叢プロファイルについて、メタボローム解析およびメタゲノム解析を用いて網羅的に解析した。その結果、糖質やアミノ酸の組成が消化管各部位において大きく異なることが明らかとなった。また腸内細菌叢の有無によってもこれらのプロファイルが大きく異なることも明らかとなった。特に、マンニトールやソルビトールといった糖アルコールが無菌マウスの下部消化管で蓄積していたのに対し、SPF マウスではほとんど検出されなかったことから、これらの糖アルコールは腸内細菌叢により代謝されることが明らかとなった。一方、ガラクトースやアラビノース、キシロースといった単糖は無菌マウスの上部消化管ではわずかに検出されたものの、下部消化管では検出限界以下だった。しかし SPF マウスでは特に下部消化管でそれらが多量に検出されたことから、食餌由来のこれらの単糖は上部消化管で吸収されるが、下部消化管では腸内細菌叢による多糖の分解により、これらの単糖が産生されていることが示唆された。また興味深いことに、いずれのアミノ酸も SPF マウスの小腸でその濃度が高く、下部消化管ではその濃度が低くなることが明らかとなった。加えて、無菌マウスよりも SPF マウスの方がその傾向が顕著であったことから、腸内細菌叢の存在によりタンパク質分解も促進されている可能性が示唆された。これらの消化管内代謝物質プロファイルと相関する腸内細菌も複数検出されたことから、消化管内代謝物質プロファイルは、宿主の消化吸收機構と細菌叢とが複雑に相互作用した結果であることが示唆された(論文1)。

研究テーマ B「メタボロゲノミクスアプローチの開発」

複雑な腸内環境を適切に評価するためには、腸内細菌叢のメタゲノム解析によりどのような腸内細菌が生息しているか、という点だけでなく、それらの腸内細菌叢からどのような代謝物質が産生されているか、を知ることが重要である。そこで SPF マウスを用いて、腸内細菌叢のメタゲノム解析および腸内代謝物質のメタボ

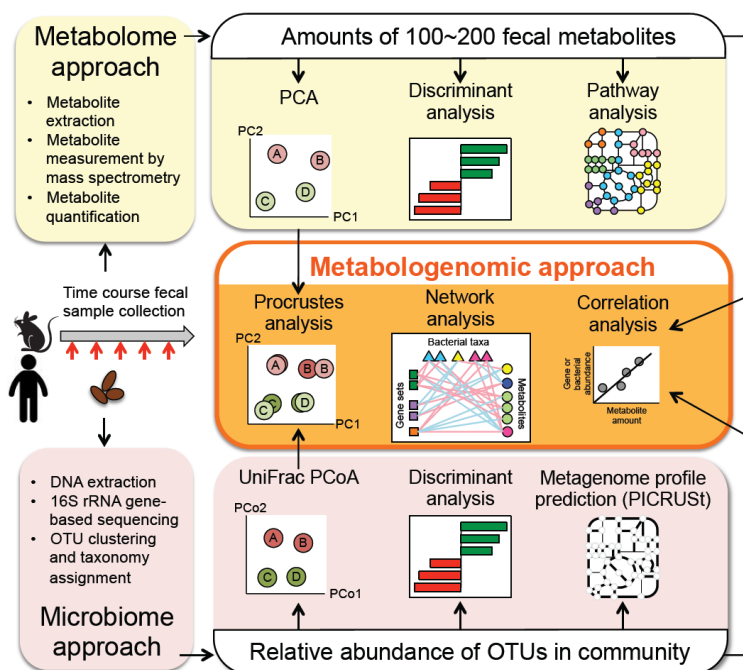


図 1: メタボロゲノミクスアプローチの概要

ローム解析により得られた両データを、バイオインフォマティクスにより統合解析するメタボロゲノミクスアプローチを開発した(図1)。本技術の特色は、①便は非侵襲的に採取可能であるため同一個体から連続情報を取得可能、②腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンスを実施することで、ハイスループットに腸内細菌叢組成情報を得ることが可能、③キャピラリー電気泳動-質量分析計を用いたメタボローム解析を実施することにより、イオン性化合物を網羅的に探索可能、④同一の便からメタゲノム解析およびメタボローム解析を実施するため、相関情報を取得可能、といった点にある。本技術を駆使して、モデル実験系として SPF マウスへの欧米食摂取試験を実施したところ、短鎖細胞酸の一つであり様々な生体修飾機能を有する酪酸の産生量が増加したことのみならず、酪酸産生量と相関して、酪酸産生菌の割合や酪酸産生経路の遺伝子群も有意に増加することを明らかにした(論文2)。従って本手法は、従来法よりも腸内環境をより詳細に理解することが可能となるため、将来的には腸内環境に基づく新たな医療・ヘルスケアの創出につながることが期待される。

研究テーマ C「慢性腎臓病と腸内細菌叢」

腸内細菌叢由来尿毒症物質が慢性腎臓病の増悪に関わることが示唆されていたが、その詳細は不明であった。われわれはこれまでに、東北大学医学部阿部教授らとの共同研究により、便秘薬の摂取による腸内環境改善が、腸内細菌叢由来尿毒症物質産生量を低下させることで、結果として慢性腎臓病の悪化を抑制できることを明らかにした(Mishima, Fukuda *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol., 26: 1787, 2015)。また、糖尿病治療薬として知られている SGLT2 阻害薬の摂取により、同様に腸内環境が改善され、血中の尿毒症物質量が有意に低下することを明らかにした(論文3)。そこで次に、無菌マウスおよび SPF マウスを用いて慢性腎臓病マウスモデルを作製し、腸内細菌叢由来尿毒症物質の探索を行ったところ、インドキシル硫酸など 11 化合物を腸内細菌叢由来尿毒症物質として同定した。この時、腸内細菌叢を持たない無菌マウスに慢性腎臓病を誘導したところ、腸内細菌叢由来尿毒症物質の量は腸内細菌を有する SPF マウスよりも少ないにもかかわらず、予想に反して無菌マウスでは SPF マウスよりも慢性腎臓病の症状がより悪化することが明らかとなった。これらの結果から、腸内細菌叢由来代謝物質には、慢性腎臓病の増悪に関与する尿毒症物質に加えて、腎臓機能を保護する役割を有する代謝物質も同時に存在する可能性が示唆された(論文 4)

研究テーマ D「腸管感染症と腸内細菌叢」

腸管感染症と腸内細菌叢との関係については様々な報告があるが、われわれはこれまでに、ビフィズス菌由来の短鎖脂肪酸の一つである酢酸が、腸管上皮のバリア機能を高めることで、腸管出血性大腸菌 O157:H7 によるマウス感染死を抑制することを明らかにしている(Fukuda *et al.*, Nature, 469: 543, 2011)。本成果は腸

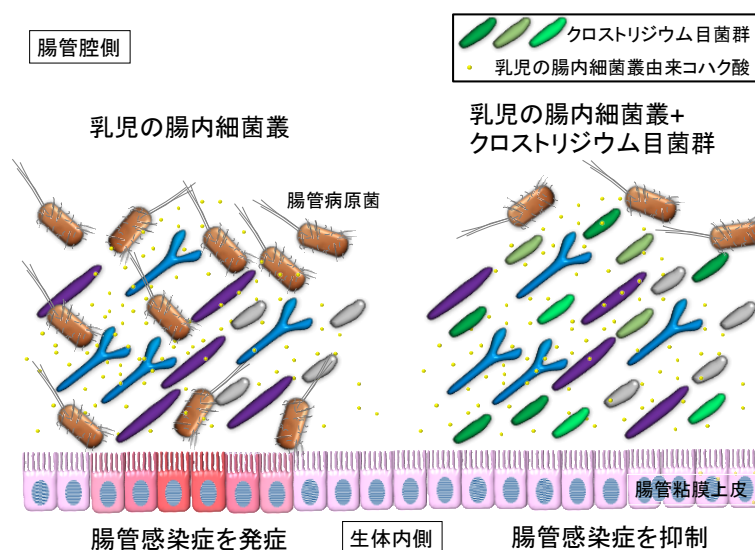


図 2: 乳児腸内細菌叢由来コハク酸がクロストリジウム目菌群の腸管内への定着を促し、腸管感染症を抑制

内細菌叢由来代謝物質が、宿主腸管細胞を介して感染症を抑制するという「宿主－腸内細菌叢間相互作用」を介した事例であったが、同様に乳児感染症でも腸内細菌叢由来代謝物質が重要であることが、ミシガン大学医学部 Nunez 教授らとの共同研究で明らかとなった(図2)。乳児の腸内環境は未成熟であるため、病原性大腸菌やサルモネラ感染に対する抵抗性が低いことが知られている。そこでメタボロゲノミクスアプローチにより乳児および成獣マウスの腸内環境を網羅的に比較解析したところ、乳児腸内細菌叢から産生されるコハク酸が腸管内の酸素濃度を低下させることで、腸内細菌の一種であるクロストリジウム目菌群が腸内に定着可能になることが明らかとなった。この時、クロストリジウム目菌群の定着により乳児腸内細菌叢が成熟化することで、結果として腸管感染症に対する抵抗性が高まることが明らかとなった(論文5)。

3. 今後の展開

本研究により、腸内細菌叢の機能理解を目的とした新規解析基盤技術として、メタボロゲノミクスアプローチを開発した。本技術を適用することで、腸内細菌叢由来代謝物質が種々の疾患と関連することをマウスモデルを用いて明らかにした。今後は更に、本技術を様々な疾患モデルマウスに適用することで、これまで未解明であった腸内細菌叢由来代謝物質と疾患との関連における分子メカニズムを明らかにする。加えて、本技術は臨床応用も可能であることから、腸管関連疾患患者のみならず、生活習慣病患者や精神疾患患者など、様々な疾患患者の腸内環境について同様にアプローチし、疾患の早期診断につながるバイオマーカー探索や、疾患の予防や治療につながるような標的腸内細菌の同定ならびにその制御法の開発を目指す。

4. 自己評価

腸内細菌叢の機能理解のみならず、その制御による疾患予防・治療基盤技術創出に向けて、腸内細菌叢のメタゲノム解析データと腸内代謝物質のメタボローム解析データを統合解析するメタボロゲノミクスアプローチを開発した。本技術を適用することにより、種々の病態モデルマウスにおいて、腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす影響と、それらを産生する腸内細菌の特定に至った。特に腸内細菌叢の制御による疾患予防・治療に向けた実用化研究においては、得られた研究成果の特許出願を精力的に行った。3.5年のさががけ研究期間内ではこれらの研究成果の全てを論文化するまでには至らなかったことから、今後は特許出願をした研究成果の論文化を順次進める予定である。本研究の実施により、腸内細菌叢由来代謝物質が疾患の発症や増悪に関与することを示せただけでなく、それらの代謝物質を産生する標的腸内細菌を同定し、創薬ターゲット候補とすることもできたことから、当初の研究目標は概ね達成出来たと考えている。今後は、特許化した研究成果の実用化により、腸内環境を標的とした新たな疾患予防・治療技術の確立を目指す。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yamamoto, Y., Nakanishi, Y., Murakami, S., Aw, W., Tsukimi, T., Nozu, R., Ueno, M., Hioki, K., Nakahigashi, K., Hirayama, A., Sugimoto, M., Soga, T., Ito, M., Tomita, M., *Fukuda, S. A metabolomic-based evaluation of the role of commensal microbiota throughout the gastrointestinal tract in mice. **Microorganisms**, 6: E101, 2018.
2. Ishii, C., Nakanishi, Y., Murakami, S., Nozu, R., Ueno, M., Hioki, K., Aw, W., Hirayama, A., Soga, T., Ito, M., Tomita, M., *Fukuda, S. A metatranscriptomic approach reveals changes in the intestinal environment of mice fed on American diet. **Int. J. Mol. Sci.**, 19: E4079, 2018.
- 3.†Mishima, E., †Fukuda, S., Kanemitsu, Y., Saigusa, D., Mukawa, C., Asaji, K., Matsumoto, Y., Tsukamoto, H., Tachikawa, T., Tsukimi, T., Fukuda, NN., Ho, HJ., Kikuchi, K., Suzuki, C., Nanto, F., Suzuki, T., Ito, S., Soga, T., Tomioka, Y., Abe, T. Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease

mouse model. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 315: F824–F833, 2018.

4. [†]Mishima, E., [†]Fukuda, S., Mukawa, C., Yuri, A., Kanemitsu, Y., Matsumoto, Y., Akiyama, Y., Fukuda, NN., Tsukamoto, H., Asaji, K., Shima, H., Kikuchi, K., Suzuki, T., Tomioka, Y., Soga, T., Ito, S., Abe, T. Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by CE-TOFMS-based metabolomics approach. **Kidney Int.** 92: 634–645, 2017.

5. Kim, YG., Sakamoto, K., Seo, SU., Pickard, JM., Gilliland, M.G. 3rd, Pudlo, NA., Hoostal, M., Li, X., Feehley, T., Stefka, AT., Schmidt, TM., Martens, EC., Fukuda, S., Inohara, N., Nagler, CR., Núñez, G. Neonatal acquisition of clostridia species protects against colonization by bacterial pathogens. **Science** 356: 315–319, 2017.

(2)特許出願

研究期間累積件数:12 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発 明 者: 福田真嗣、石井千晴、富田勝

発明の名称: 糞便試料から物質を抽出する方法

出 願 人: 学校法人慶應義塾大学

出 願 日: 2016/9/8

出 願 番 号: PCT/JP2016/004104

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【受賞】

1. バイオインダストリー協会 第1回バイオインダストリー奨励賞「腸内細菌叢機能の包括的理解と腸内デザインによる新規ヘルスケア産業の創出」2017年10月11日
2. 安藤スポーツ・食文化振興財団 第21回安藤百福賞発明発見奨励賞「腸内環境の最先端研究と腸内デザインベンチャーの起業」2017年3月13日
3. 文部科学省科学技術・学術政策研究所 科学技術への顕著な貢献 2015(ナイスステップな研究者)「腸内フローラの機能解明を目指した基礎研究成果から、腸内環境デザインによる健康長寿社会を実現するバイオベンチャー企業の設立」2016年2月12日

【プレスリリース】

1. 腸内細菌叢のさらなる解明につながる難培養性腸内細菌培養技術の開発に向けた共同研究を開始 2018年6月21日
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2018/6/21/28-45012/>
2. 腸内細菌叢の成熟化が乳幼児期の腸管感染抵抗性をもたらすことを発見
ー特定の腸内細菌の獲得が腸管感染症予防のカギー 2017年4月21日
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/4/21/28-20422/>
3. 「腸腎連関」: 腸内細菌叢のバランス制御が慢性腎臓病悪化抑制のカギ
ー腸内細菌叢は腎臓病に対して良い面と悪い面の二面性を持つー 2017年4月13日
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2017/4/13/170413-1.pdf>